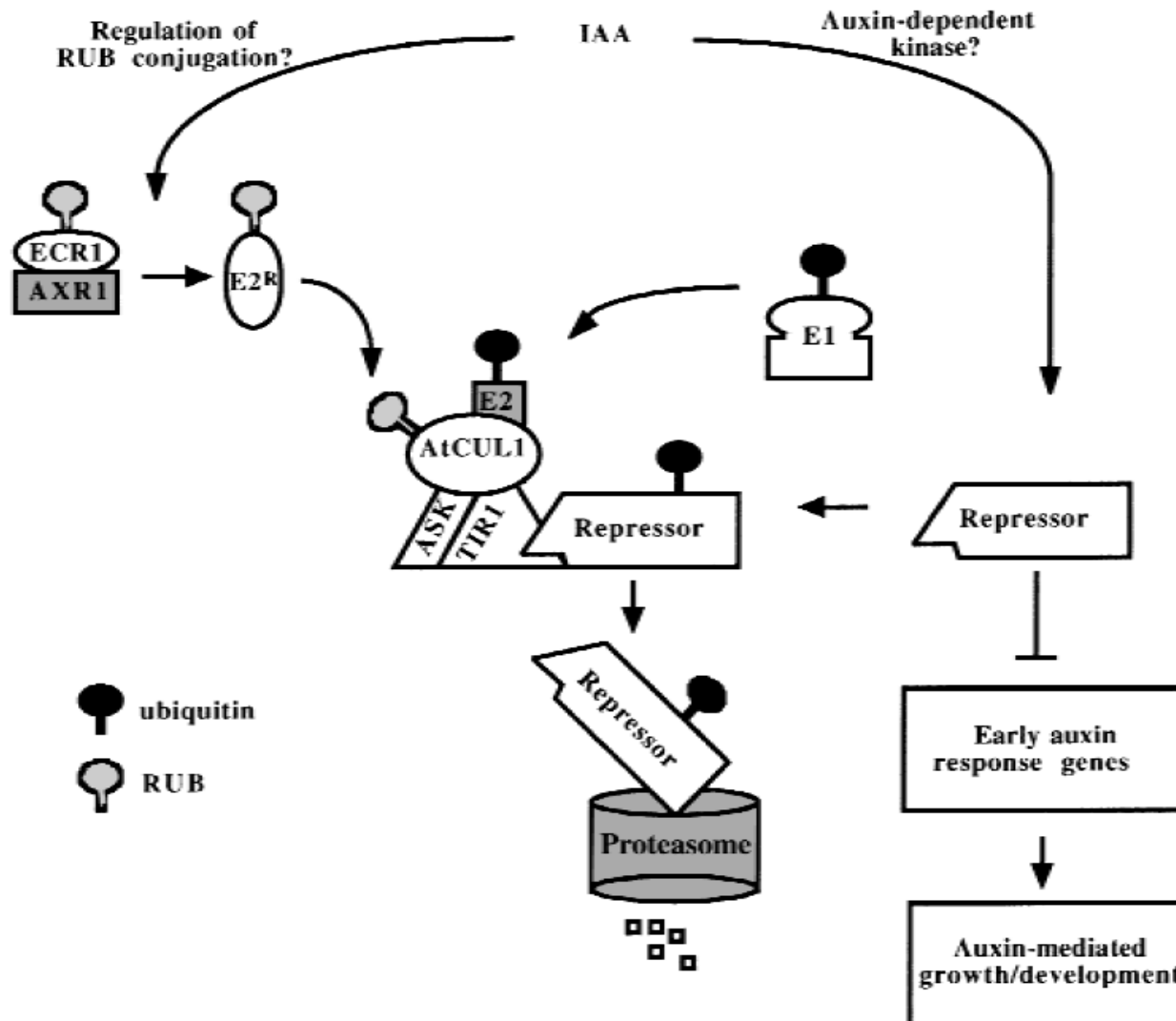


Auxin regulates SCF^{TIR1}- dependent degradation of AUX/IAA proteins

William M. Gray^{*2}, Stefan Kepinski²³, Dean Rouse^{3§},
Ottoline Leyser³ & Mark Estelle^{*}

Letztes Model

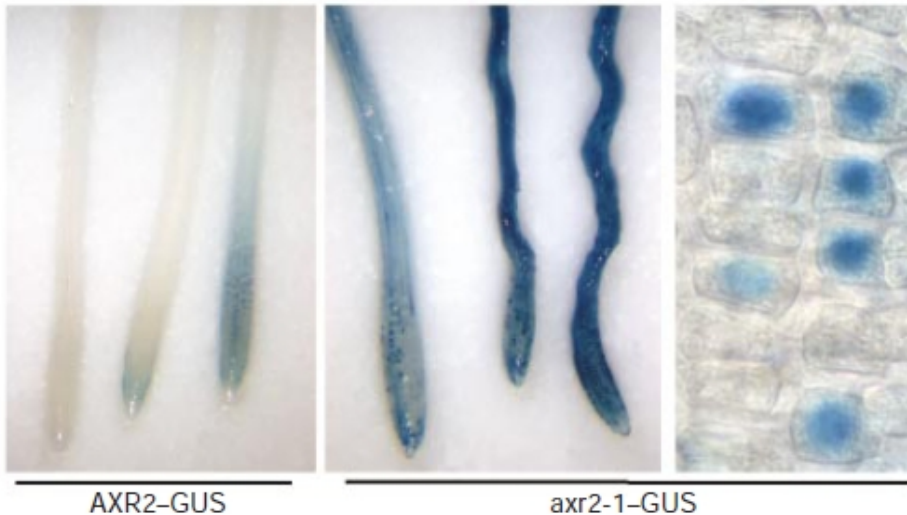


Ziele

- Nachweis der Interaktion zwischen AUX/IAA Proteinen und SCF^{TIR1}
- Wirkung von Proteasom-Inhibitor und Mutationen in AUX/IAA Genen auf diese Interaktion
- Wirkung von Auxin auf diese Interaktion

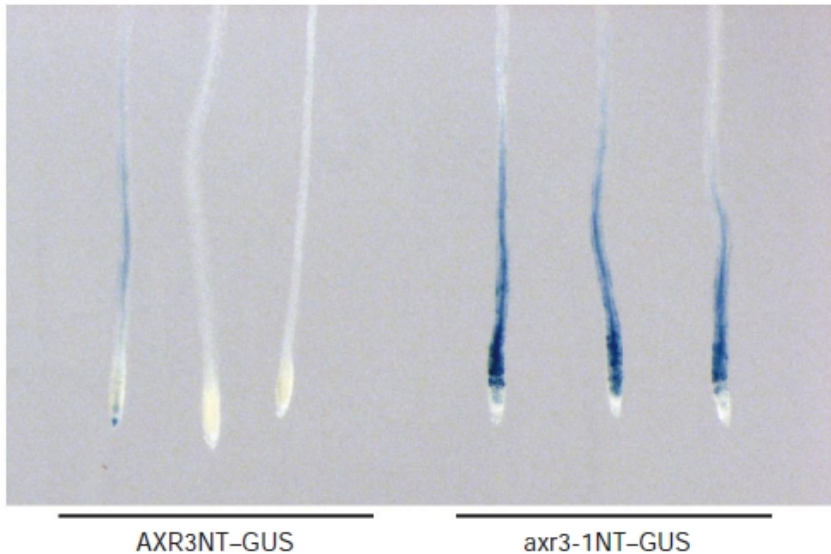
Analysis of AUX/IAA stability with GUS fusions

GUS- Fusionsproteine mit Wildtyp- und Mutationsgenen



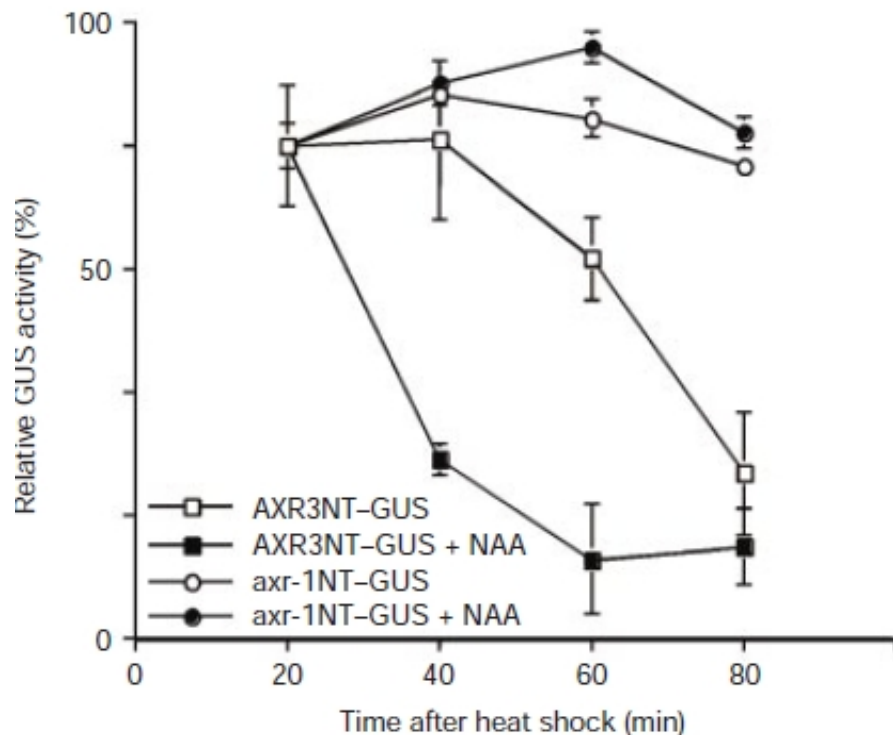
- Mutante → hohe GUS-Aktivität in Zellkernen der Wurzelspitzenmeristeme
 - Wildtyp → geringe GUS-Aktivität
- Erhöhte Stabilität in den mutierten Proteinen

Heat-shock Promoter + N-terminale Domäne von AXR3



- GUS-Aktivität in den Mutanten ist viel stärker als im Wildtyp
- Domäne I und II ausreichend für Genexpression

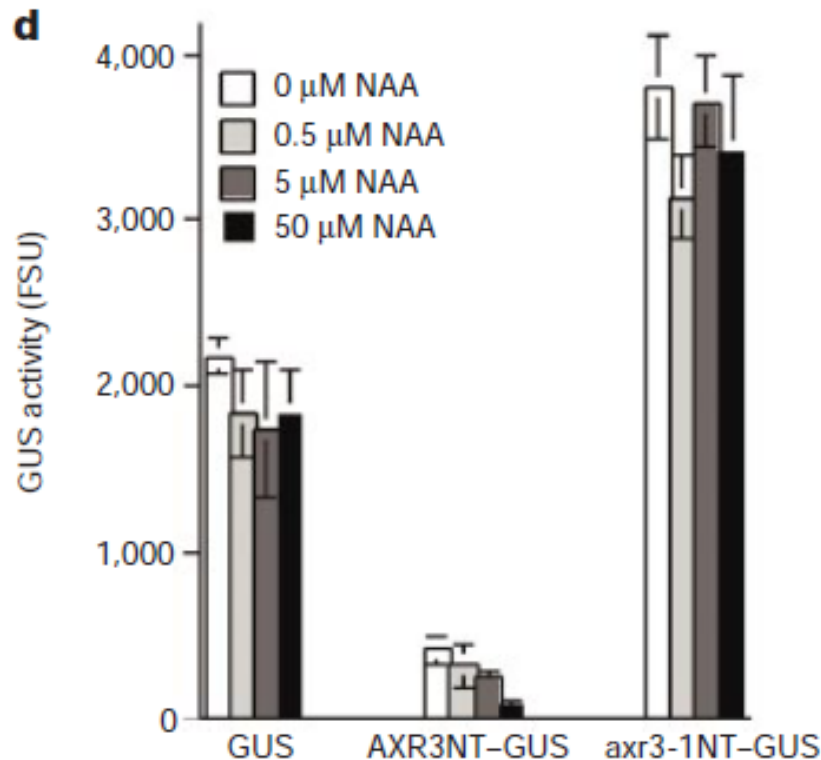
GUS-Aktivität nach heat-shock



- Wildtyp: rapider Abbau der Proteine durch Auxinbehandlung
- Mutation: keine relevante Abnahme der GUS-Aktivität trotz Auxinbehandlung

→ Auxin fördert Abbau von AUX/IAA Proteinen

Floureszenzmessung der GUS-Proteine



- Wildtyp:
mit steigender Auxinkonzentration nimmt GUS-Aktivität ab
- Mutation:
Auxinkonzentration hat keinen Einfluss auf GUS-Aktivität

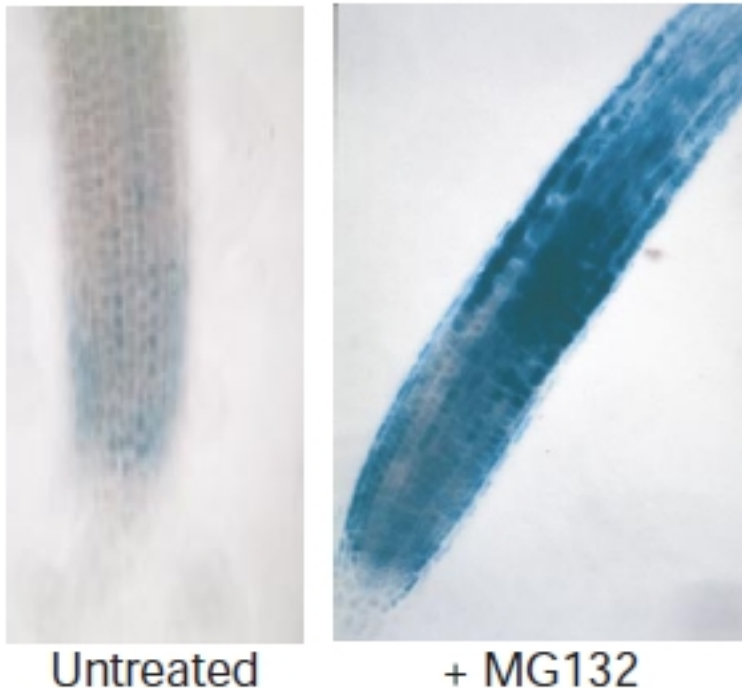
Ergebnisse

- Kurzlebige Proteine
- AUX/IAA Proteine auxinabhängig
- erhöhte Proteinstabilität bei Mutanten
 - Verhinderung des Auxin-vermittelten Abbaus

Ubiquitin-mediated degradation of AUX/IAA proteins

Ist ubiquitin-proteasom-pathway am Abbau der Proteine beteiligt ?

35s::AXR2-GUS

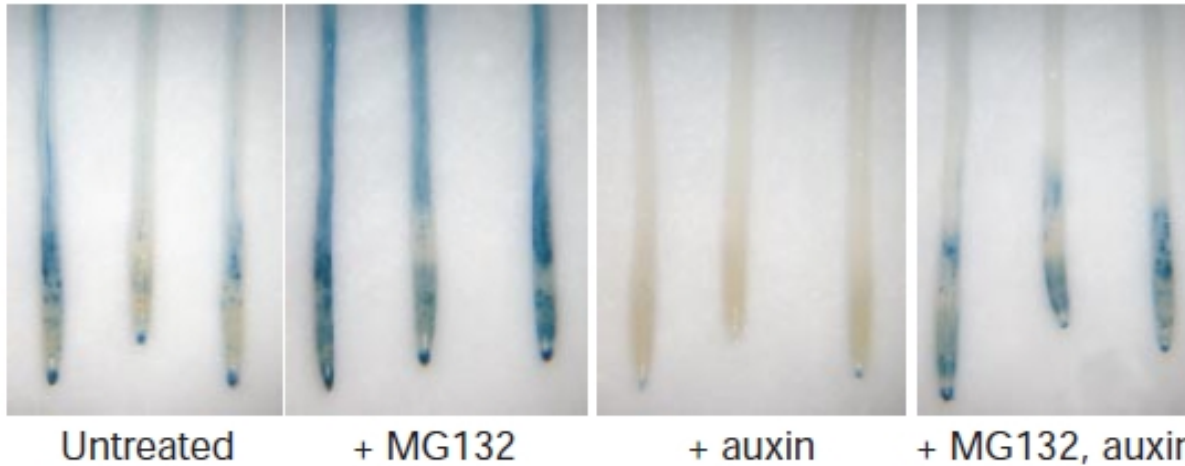


- Ohne Proteasominhibitor → keine GUS-Aktivität
- Mit Proteasominhibitor → GUS-Aktivität

Antwort: JA!

b

HS::AXR3NT-GUS



- + MG132 → starke GUS-Aktivität
- + Auxin → keine GUS-Aktivität
- + Auxin / +MG132 → Reduzierung der Proteasominhibition durch Auxin

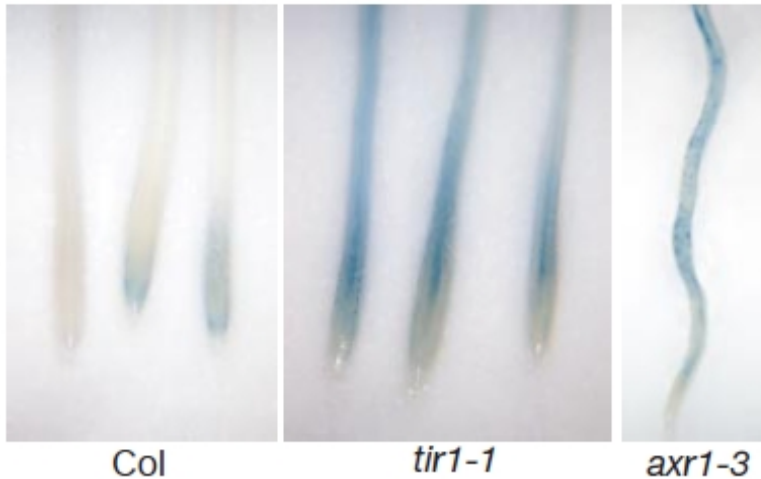
Ergebnisse

- Auxin und MG132 beeinflussen sich gegenseitig
- Auxin fördert den Proteinabbau
- MG132 verhindert den Proteinabbau
- Ubiquitin-Proteasom-Pathway ist am Abbau der AUX/IAA Proteine beteiligt

Wirkung der Mutationen

a

35S::AXR2-GUS

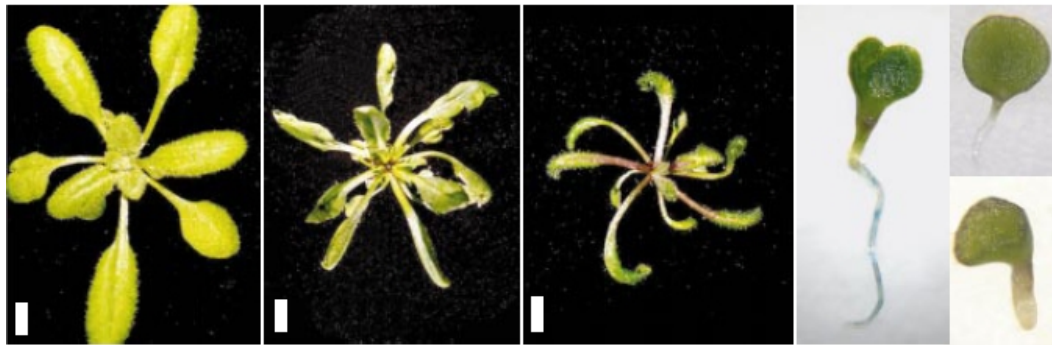


→ Bindung an SCF-Komplex (*tir1-1*)
wichtig für Abbau

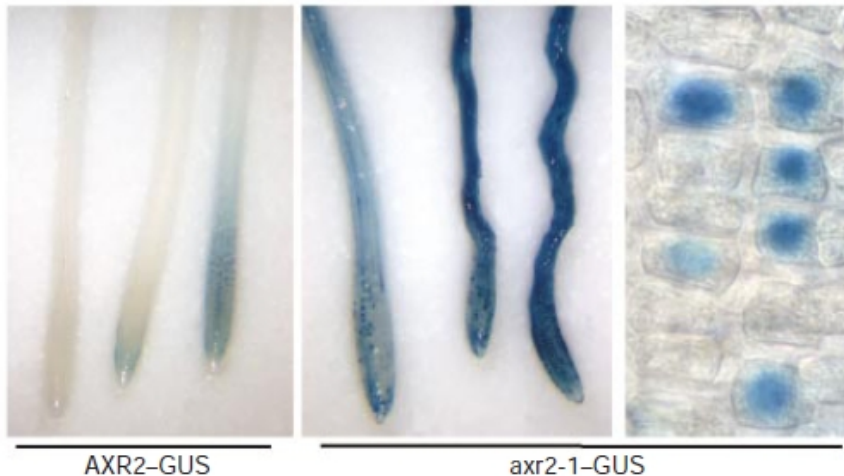
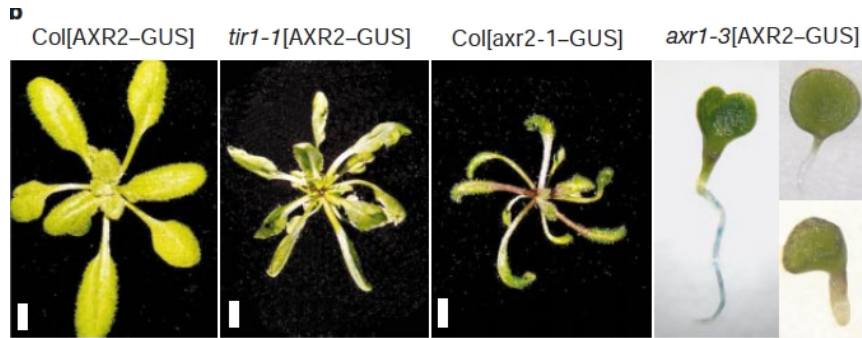
→ eine zu hohe AUX / IAA Konzentration wirkt schädlich = Proteinakkumulation wirkt toxisch

b

Col[AXR2-GUS] *tir1-1*[AXR2-GUS] Col[*axr2-1*-GUS] *axr1-3*[AXR2-GUS]



Phänotypen

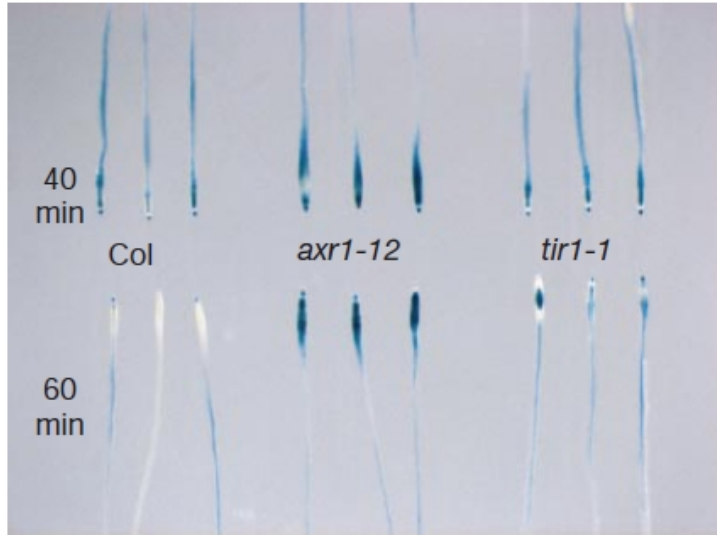


- *tir1-1* + *axr2-1*: leaf curling, reduzierte Apikaldominanz (*axr2-1* schwächer)
 - *axr1-3*: fehlende Wurzel, 1 Keimblatt -> sterben ab
- *axr* liegt im Stoffwechselweg weiter upstream als *tir*

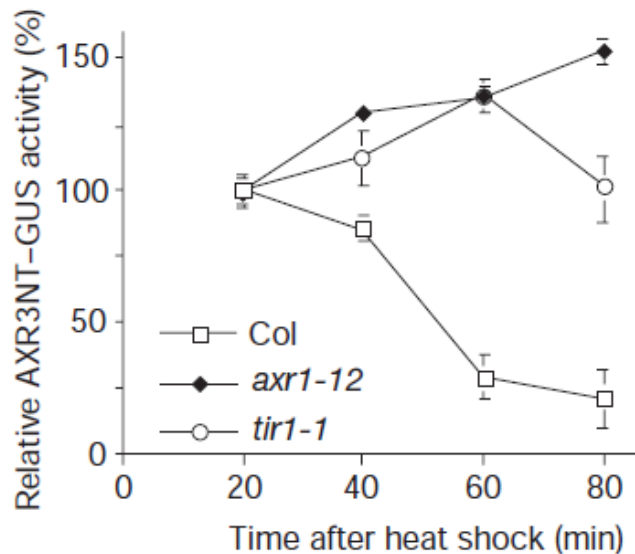
GUS-Aktivität nach heat-shock

c

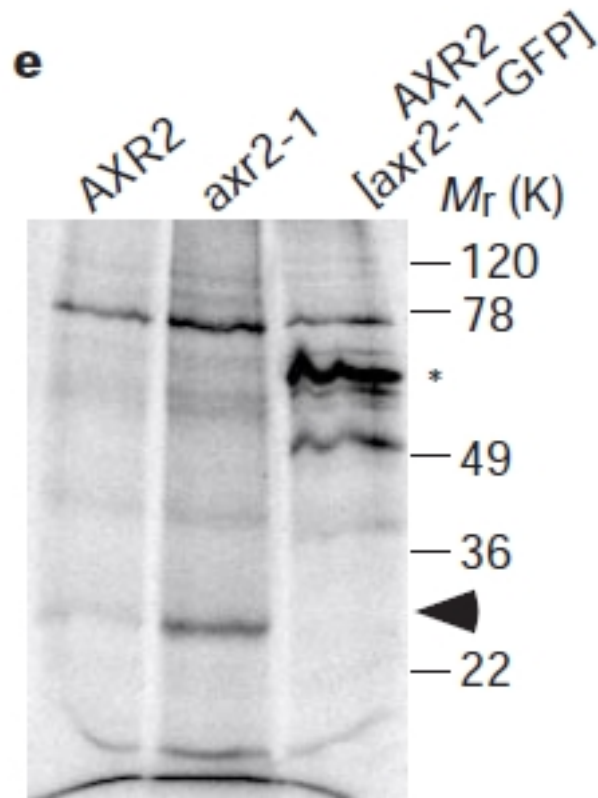
HS::AXR3NT-GUS



- WT: schnelle Abnahme der GUS-Aktivität
- *axr1-12*: keine Veränderung der GUS-Aktivität (sterben ab wie *axr1-3*)
- *tir1-1*: leichte Abnahme der GUS-Aktivität



Immunopräzipitation



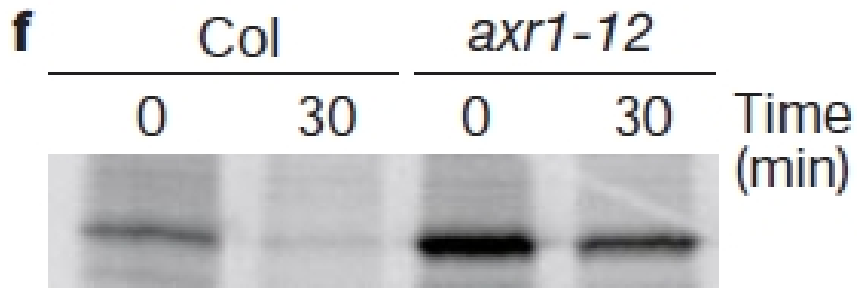
- In *axr2-1* Pflanzen wird mehr AXR2-Protein detektiert als in WT
- Fusionsprotein hat größeres Molekulargewicht und detektiert mehr AXR2 als WT und *axr2-1*

Pulse-chase-Experiment

- Pflanzen werden mit markierten Vorläufermolekülen inkubiert (=pulse)
 - Vorläufermolekül wird durch Überschuss an unmarkierten Molekülen ersetzt (=chase)
 - Stabilität der Verbindungen die während pulse Moleküle eingebaut haben, kann radioaktiv nach bestimmten Zeitspannen gemessen werden
- Halbwertszeit und Stabilität eines Proteins kann bestimmt werden

Pulse-chase

- *axr2* wird langsamer abgebaut als Wildtyp



→ *axr2* hat 3x längere Halbwertszeit als WT

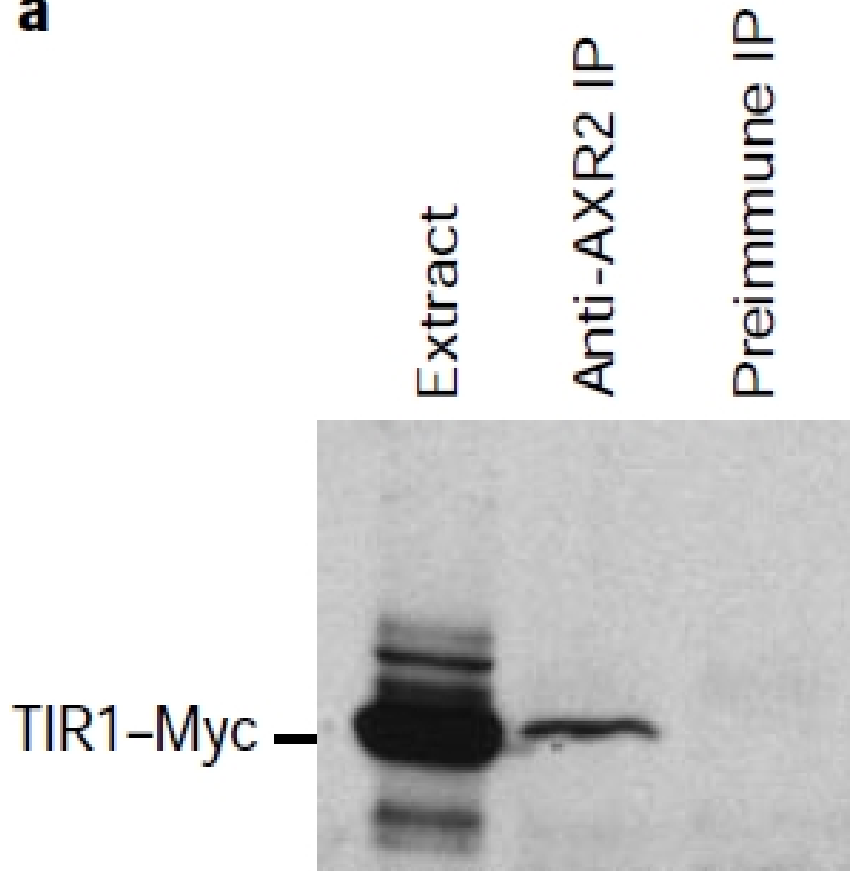
Ergebnisse

- Auxin-response-Defekt ist stärker in axr1-12 ausgeprägt als in tir1-1
- Halbwertszeit und Stabilität der mutierten Proteine ist größer als die der Wildtyp-Proteine
- Bindung an SCF-Komplex ist wichtig für den Abbau der Proteine

AUX/IAA proteins interact with
SCF^{TIR1}

Immunopräzipitation: tir1-1[TIR-myc]- Extrakte

a

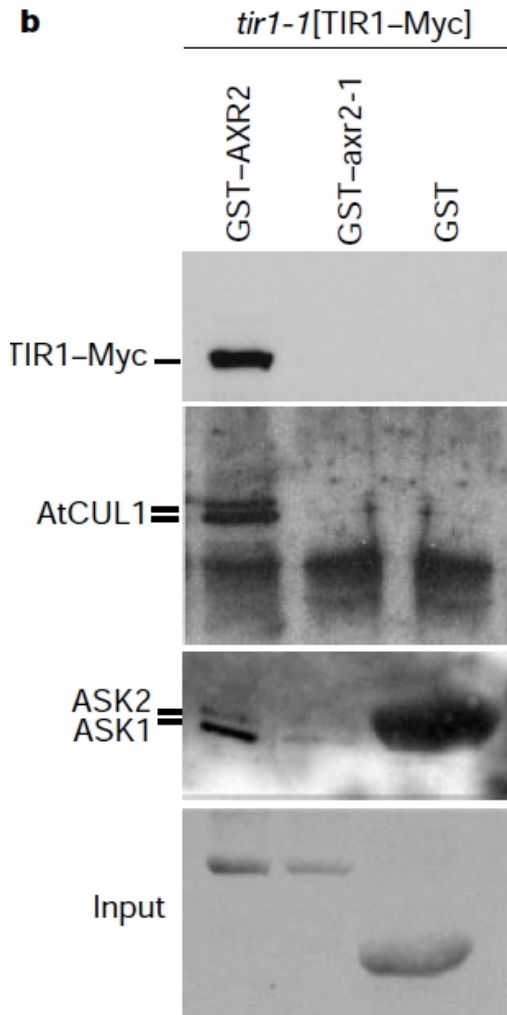


- Extrakt: TIR1-Myc konnte detektiert werden
- Anti-AXR2: ebenso Interaktion mit TIR-Myc

→ TIR1 interagiert mit AXR2

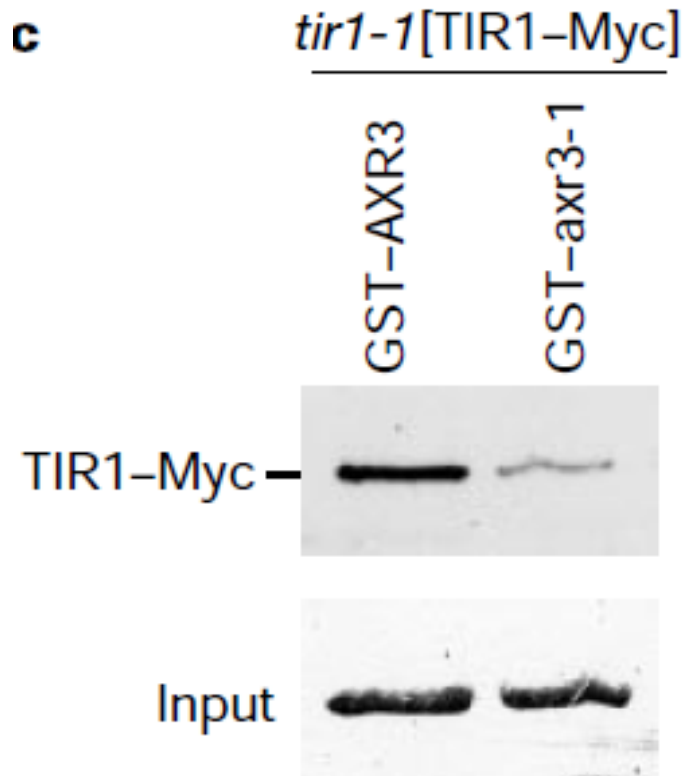
Prüfung auf Interaktion von AUX/IAA mit SCF-Untereinheiten

→ Pull-down-assay



- Nur Interaktionen von Wildtypprotein mit allen SCF-Untereinheiten
- *axr2-1* Mutanten können nicht an SCF-Komplex binden

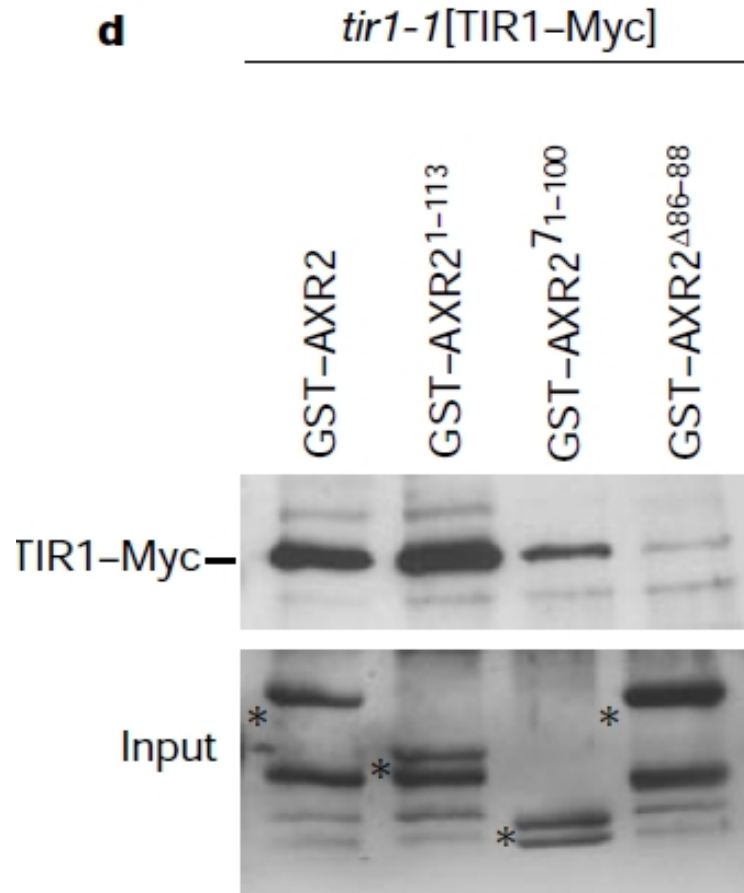
Untersuchung von AXR3 auf Interaktion mit TIR



- Interaktion von *axr3-1* mit TIR1 ist vorhanden, aber weniger stark als WT

→ AUX/IAA Mutanten können nicht mit dem SCF^{TIR1}-Komplex eine Interaktion eingehen

Untersuchung der Domäne II der AUX/IAA Proteine

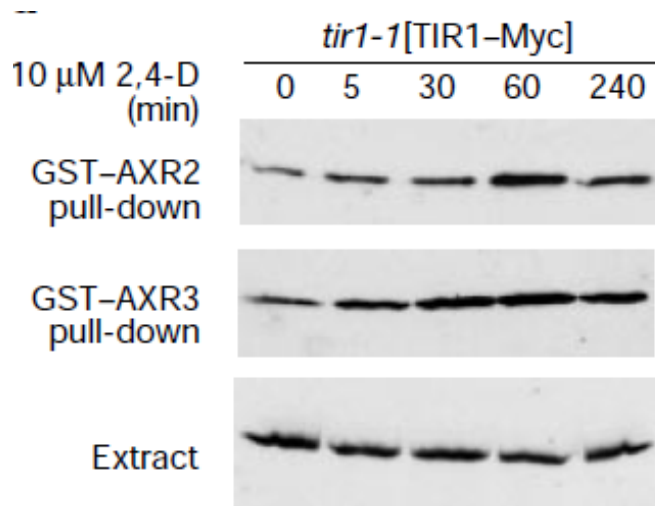


- Domäne II allein reicht zur Interaktion mit TIR1 aus
- Deletionen in Domäne II verhindern Interaktion mit TIR1-Myc

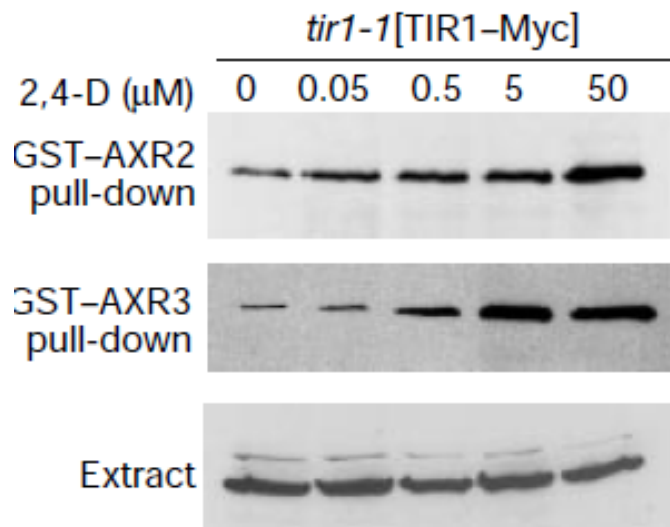
Ergebnisse

- AUX/IAA Proteine interagieren mit TIR1 des SCF-Komplex
- Domäne II funktioniert als TIR1-Interaktionsdomäne
- Domäne II der AUX/IAA Proteine ist notwendig und ausreichend für die Interaktion mit SCF^{TIR1}

Einfluss von Auxin auf Interaktion



- Auxin-behandelte Pflanzen zeigen steigende Interaktion von TIR1-Myc und AXR2 Proteine



- Auxin-Konzentrationserhöhung zeigt auch erhöhte Interaktionen

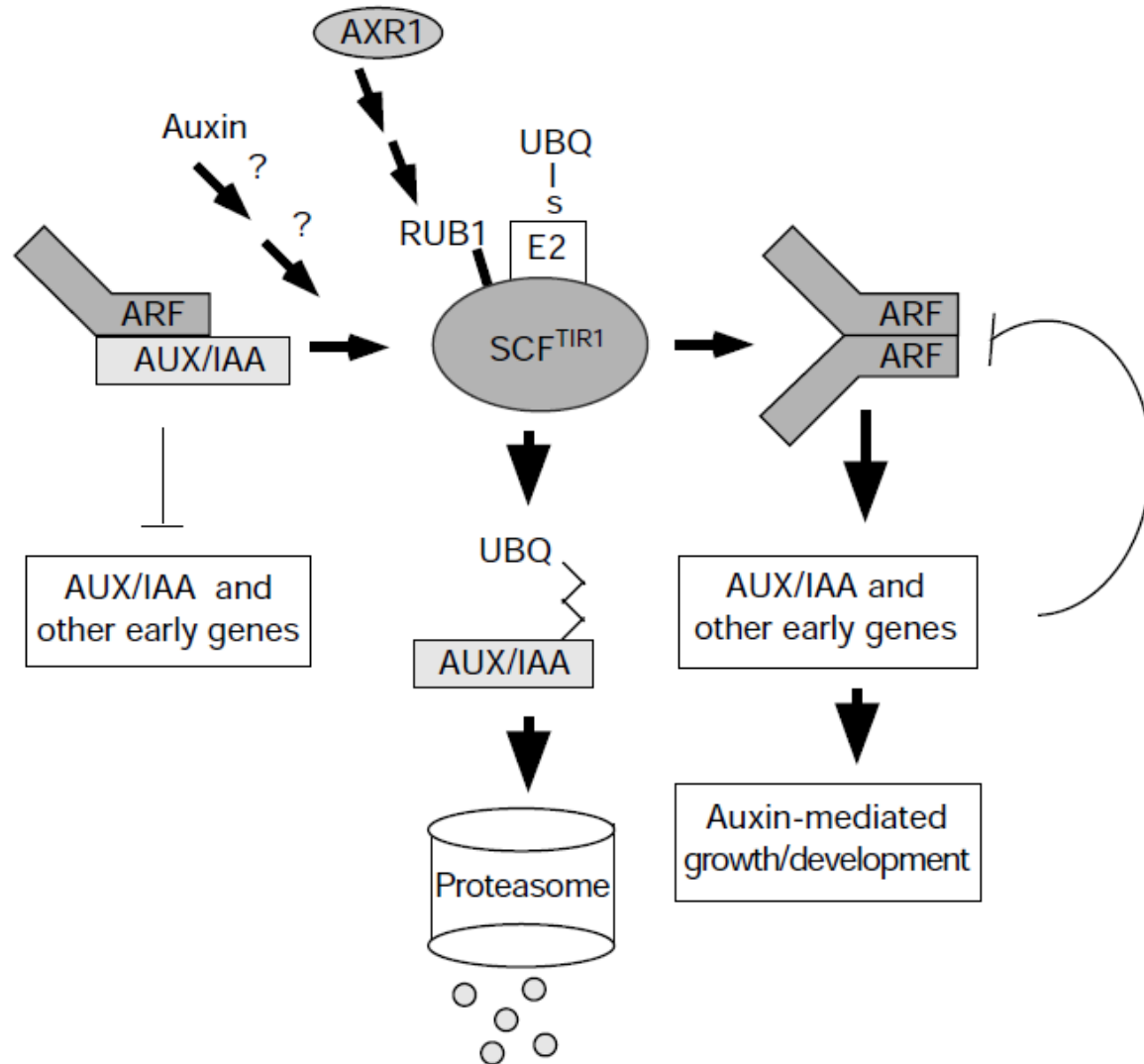
Ergebnisse

- Auxin fördert die Interaktion zwischen AUX/IAA Proteinen und SCF^{TIR1}
- Niedrige Konzentration von Auxin fördern schon die Interaktion
- Steigerung der Auxinkonzentration verstärkt die Interaktion von AUX/IAA und SCF^{TIR1}

Zusammenfassung

- Auxin fördert den Abbau der AUX/IAA Proteine
 - Domäne II der AUX/IAA Proteine interagiert mit TIR1 vom SCF^{TIR1}- Komplex
 - Auxin fördert diese Interaktion
- SCF-Komplex vermittelt den Abbau der AUX/IAA Proteine im Proteasom

Neues Model



Quellen

- William M. Gray, J. Carlos del Pozo, Loni Walker, et al.: Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana*; *Genes Dev.* 1999 13: 1678-1691
- William M. Gray^{*2}, Stefan Kepinski²³, Dean Rouse^{3§}, Ottoline Leyser³ & Mark Estelle^{*}: Auxin regulates SCFTIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins; *NATURE* 15 NOVEMBER 2001; VOL 414
- Glossar zum Paper